

## 論文審査の結果の要旨

中島 健一朗

申請者氏名

味覚科学と食品産業の分野が先進国の糖の過剰摂取による疾病への対策として長年に亘って興味を示してきたものに甘味タンパク質がある。8種類の存在が知られ、いずれも重量比率あたりショ糖の数百から数千倍もの強い甘味を示す。なかでも、西マレーシア産のクルクリゴの果実に含まれるネオクリンは自身が甘いだけでなく、その後に酸や水を味わうと強い甘味を呈するユニークな性質(味覚修飾活性)を持つため注目されている。しかし、この性質がどのようなメカニズムで生じるのかは不明であった。そこで、本論文ではネオクリンの味覚修飾活性のうち、特に酸誘導性の甘味の分子機構の解明を試みた。

本論文は3章からなり、1章にてネオクリンがヒト甘味レセプターに受容されることを示し、2章にて麹菌を宿主とした組換えネオクリンの発現系を構築し、3章にて麹菌発現系により作出したネオクリン変異体をツールとして、培養細胞系により酸誘導性の甘味活性の分子機構の解析を行っている。

### ネオクリンのヒト甘味レセプターへの作用の検証

近年、ヒト甘味レセプターがGタンパク質共役型受容体(GPCR)であるT1R2とT1R3のヘテロマー(hT1R2-hT1R3)からなり、糖類、アミノ酸、タンパク質など化学類型の異なる物質を受容することが明らかになった。そこで、ネオクリンも他の甘味物質と同様、hT1R2-hT1R3に受容されるかどうか検証した。その結果、hT1R2、hT1R3、キメラ変異体G $\alpha$ タンパク質の3者を導入した培養細胞を用いたカルシウムイメージング解析により、ネオクリンがヒト甘味レセプターに受容されることを確認した。

### 麹菌を宿主とした組換えネオクリンの発現系の構築

次に、構造機能相関の解析に役立つネオクリン変異体を取得するため、組換えネオクリンの発現系を構築した。ネオクリンが糖鎖の付加した酸性サブユニットNASと塩基性サブユニットNBSがジスルフィド結合で架橋された約22 kDaのヘテロダイマーであることから、宿主には、翻訳後修飾された組換えタンパク質を分泌生産できる麹菌を用いた。

NASとNBSをそれぞれ、麹菌の分泌タンパク質 $\alpha$ -アミラーゼとKEX2プロテアーゼ切断配列を間にはさんで融合した。KEX2プロテアーゼ切断配列の周辺配列の改良を行った後、両発現プラスミドの量を検討してから麹菌に導入したところ、組換えネオクリン生産株の取

得に成功した。生産量は培地 1.3 mg/L 程度であった。タンパク質化学的な解析から、組換えネオクリンが天然ネオクリン同様、糖鎖の付加したヘテロダイマーであることを確認した。また、細胞および官能評価により組換えネオクリンの甘味と酸誘導性の甘味活性は天然ネオクリンの活性に匹敵することを示した。

#### ネオクリンの酸誘導性の甘味を定量的に測定できる培養細胞評価系の構築とそれに基づく酸誘導性の甘味性機構の解析

最後に、酸誘導性の甘味を客観的・定量的に測定できる細胞評価系の構築を行った。その結果、hT1R2-hT1R3 発現細胞のネオクリンへの応答は pH が中性から酸性に低下するにつれ増加し、応答の 50% 値は pH 7.1 であった。そこで、この pH 付近でヒスチジンのイミダゾール基 (pKa 6.5) がプロトン化されることが酸誘導性の甘味活性に関与すると予想し、ネオクリンの 5 つのヒスチジン残基全てをアラニンに置換した HA 変異体を麹菌発現系で作出した。その結果、この変異体はネオクリンとは異なり酸性、中性いずれの pH でも強い甘味を呈し、酸誘導性の甘味活性にヒスチジン残基が重要な役割を果たすことが示された。また、ネオクリンと HA 変異体が同じ中性 pH では、それぞれ弱い甘味と強い甘味を示すことに注目し、両者を異なる割合で混合して細胞に投与した。その結果、中性 pH ではネオクリンは hT1R2-hT1R3 を活性化せず、HA 変異体を競合的に阻害することを見出した。これらの結果から、ネオクリンは甘味活性型と不活性型の pH 依存的な平衡状態にあり、中性 pH では hT1R2-hT1R3 のアンタゴニストとして作用するが、酸性 pH ではアゴニストに変化して強い甘味を引き起こすという新たな酸誘導性の甘味活性のモデルを提唱した。

以上のように、本論文では、ネオクリンのヒト甘味レセプターへの作用様式が pH によって変化するため、酸誘導性の甘味が生じることを明らかにした。この結果は、甘味受容機構の解析だけでなく、他の GPCR のリガンド認識機構や活性化機構を理解する上でも役立つものである。また、長年にわたって食品生産に利用され、GRAS(generally recognized as safe) 指定を受けている麹菌を宿主としてネオクリンとその変異体の生産を行い得ることは、実用的観点からも意義深い。よって審査員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文としての水準を十分に満たしたものであると認めた。